

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25462282

研究課題名(和文) 蛍光試薬5-アミノレブリン酸の放射線増感作用を悪性脳腫瘍治療へ応用する

研究課題名(英文) Application of radiosensitizing effect of 5-aminolevulinic acid for malignant glioma therapy

研究代表者

山本 淳考 (YAMAMOTO, Junkoh)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80461565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光感受性物質として臨床応用されている5-アミノレブリン酸(ALA)の放射線増感作用のメカニズムについて悪性グリオーマ細胞株を使用し、放射線照射後に遅発性に発生する活性酸素種とミトコンドリアに着目し評価を行った。5-ALAは、悪性グリオーマ細胞株において、ミトコンドリアを中心に放射線照射後遅発性に活性酸素種産生を増強させ、また、宿主抗腫瘍免疫を誘導させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We assessed mechanism of radiosensitizing effect of 5-aminolevulinic acid (ALA) in glioma cells focusing on the delayed production of reactive oxygen species (ROS) after ionizing irradiation and mitochondria. 5-ALA induces enhancement of delayed ROS production and host antitumor response in glioma.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：5-アミノレブリン酸 グリオーマ 放射線治療 ミトコンドリア 活性酸素種

1. 研究開始当初の背景

現在、悪性脳腫瘍(グリオーマ)に対する治療戦略として、外科的手術、化学療法、放射線治療を用い集学的に行われているが、こと、悪性脳腫瘍の代表である、膠芽腫に関しては、平均余命は約1~1.5年であり、5年生存率は7%前後と極めて低く、これら治療成績は約30年間変わっていないのが現状である(Shapiro WR: J Neurosurg 71(1): 1-9, 1989)。悪性グリオーマに対する外科的治療において、神経合併症を来すことなく可能限りの摘出が重要であるが、悪性グリオーマの高い細胞浸潤能のため正常脳との境界が不明瞭となり困難な場合が多い。

5-アミノレブリン酸(5-ALA)は、ヘム合成経路の最初の天然アミノ酸であるが、ヘム合成経路で変換されプロトポルフィリンIX(PpIX)が生成される。正常細胞においては、PpIXに鉄が挿入され、ヘムが合成されるが、悪性グリオーマなどのがん細胞においてはPpIXからヘムへの変換が障害され結果的にPpIXを蓄積する(Ishizuka M: Int Immunopharmacol. 2011; 11(3): 358-65)。このPpIXが光感受性物質の性質を有する。すなわち、1)光照射により、活性酸素(一重項酸素:102)を発生させ周囲組織に対し酸化損傷を引き起こす。2)異なる波長の光照射により、光感受性物質が蛍光を発する。前者の性質は、光線力学療法(photodynamic therapy:PDT)で利用されており、後者は、術中蛍光診断あるいは光線力学的診断(fluorescence-guided surgery)として利用されている。すなわち、光感受性物質が、腫瘍細胞に選択的に取り込まれれば、PDTと術中蛍光診断によって、残存、あるいは、正常脳組織に浸潤した腫瘍細胞を可視化し、そして消滅させることが可能となる。悪性グリオーマについては、この5-ALAを用いた術中蛍光診断が極めて有効であることが報告され、すでに世界中の脳神経外科施設で一般的に用いられている。(Stummer W: Lancet Oncol, 7: 392-401, 2006)この手法では浸潤した悪性脳腫瘍に取り込まれた5-ALAから誘導されPpIXの蓄積した腫瘍病変が蛍光をはなち、腫瘍と正常脳組織との区別が容易となり、eloquent areaなど神経機能温存を重視した部分の手術に威力を発揮する。しかしながら、正常組織に浸潤した悪性グリオーマは完全には摘出できず、神経機能温存を考慮し、この光感受性物質を取り込んだ腫瘍を残さざるをえなくなる。

さて、この光線力学療法に利用されているポルフィリン化合物であるが、従来より放射線感受性も持つことが報告されている。(Luksiene Z: Cancer Lett. 2006 Apr 8;235(1):40-7)すなわち、光感受性物質を投与し、同時に放射線治療を行うことにより、その効果をより高めることができる可能性がある。現在、悪性脳腫瘍に対する治療とし

て、外科的治療に続き、放射線治療が重要な役割を果たしている。放射線照射技術の進歩により、以前から行われている脳腫瘍に対する拡大局所照射などの分割照射法だけでなく、最近では、定位的照射法または、強度変調放射線治療を用いることで、腫瘍に対して、外科的治療が困難な深部の微小病変もしくは、脳幹部周囲などの複雑な形状の腫瘍性病変に対しても、正確な放射線照射が可能となっている。しかしながら、放射線による治療効果は、照射線量に比例するが、線量を上げることにより、それだけ正常脳への損傷が大きくなり、時に放射線壊死や、脳卒中といった致命的な合併症まで報告されている。(Bowers DC: J Clin Oncol 24: 5277-5282, 2006))悪性グリオーマに高い親和性を持つ光感受性物質と放射線治療の相乗効果が悪性グリオーマに対して認められれば、術中蛍光診断によって、安全に悪性グリオーマが摘出され、術後補助療法としての放射線治療効果を高めるのみならず、被ばく線量を減少させることが可能となり、正常脳組織に対する放射線の影響を軽減することが可能となる。放射線治療および5-ALAは、生体に対して安全性が確立されており、すでに臨床の現場で使用されていることから、これらを組み合わせた治療は、比較的短期間での臨床応用が可能であるが、5-ALAの放射線増感作用に関する研究はほとんどされていない。われわれは5-ALAの悪性グリオーマに対する高い腫瘍集積性に着目し、その放射線増感作用をin vitroで証明した。すなわち、悪性グリオーマ細胞株において、細胞株間の差はあるが5-ALAは放射線感受性増強効果を有するが、1回の放射線照射と5-ALAの併用により得られる殺細胞効果は弱い、分割照射にすることにより5-ALAの放射線感受性増強効果が蓄積され、殺細胞効果が増強されるということ、さらに、放射線により悪性グリオーマ細胞株内に発生する活性酸素種は、5-ALAを投与することで増加し、発生した活性酸素種の局在が、5-ALAにより誘導される細胞内PpIXの局在に一致することを証明した(科学研究費助成事業、若手研究(B)20791024)。

2. 研究の目的

本研究では、5-ALAと放射線治療を併用した悪性グリオーマへの臨床応用へと展開するための基盤研究として、悪性グリオーマにおける5-ALAの放射線感受性増強効果のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) ラットグリオーマ皮下腫瘍モデルにおける5-ALAの放射線増感作用

ラットグリオーマ細胞株(9L)をFisher344ラットの皮下に移植し皮下腫瘍を作成。予備

実験として、皮下腫瘍モデルでの 5-ALA から誘導される PpIX 蓄積状態を確認するために、5-ALA (100 mg/kg) をラット尾静脈より投与し、3 時間後に皮下腫瘍の PpIX 蓄積状態を蛍光観察および高速クロマトグラフィー法にて評価した。次に、同様に皮下腫瘍モデルを作成後、皮下腫瘍が 6-8 mm 程度になった後に放射線治療を施行。5-ALA (100 mg/kg) をラット尾静脈より投与し、3 時間後に放射線照射 (MBR-1520R; Hitachi Engineering & Service Co., Ltd., Japan) を施行 (2 Gy)。この処置を連続 5 日間施行 (total 10 Gy) し、その後の腫瘍サイズを測定した。治療 16 日後まで腫瘍サイズを測定したのちに、皮下腫瘍を摘出し病理学的検討を行った。

(2) 放射線照射後の悪性グリオーマ細胞株における PpIX 産生能

悪性グリオーマ細胞株 (9L, U251) を使用し、放射線照射を施行 (10 Gy)。照射直後、8 時間後および 20 時間後に 5-ALA (1 mM/4 時間) で処理を行い、蓄積される PpIX 量をフローサイトメーター (EC800; Sony Biotechnology, Tokyo, Japan) を使用し評価を行った。

(3) ラットグリオーマ細胞株における 5-ALA 併用放射線照射後の活性酸素種発生

悪性グリオーマ細胞株 (9L, U251) を使用し、5-ALA (1 mM/4 時間) で処理を行った後に、放射線照射を施行 (10 Gy)。照射 12 時間後の細胞における活性酸素種産生状態を活性酸素蛍光プローブ (DCFDA) で処理し、フローサイトメーター (EC800; Sony Biotechnology, Tokyo, Japan) にて評価を行った。また、共焦点レーザー顕微鏡を使用し発生する活性酸素種産生状態を評価した。さらに、放射線照射後 (10 Gy) の悪性グリオーマ細胞株に対して、5-ALA にて同様に処理を行い活性酸素種産生の状態をフローサイトメーターで評価をした。

(4) 悪性グリオーマ細胞株における 5-ALA から誘導される PpIX 蓄積量の変化と放射線増感作用

ニューキノロン系抗生物質であるシプロフロキサシン (CPF) は、5-ALA から誘導される PpIX を増加させることが報告されている (Ohgari Y, J Biochem 149; 153-160, 2011)。そのため、悪性グリオーマ細胞株を CPF で処理を行い、5-ALA から誘導される PpIX 蓄積量をフローサイトメーターにて評価した。その後、CPF を使用し、PpIX の蓄積量と放射線増感作用の関連について悪性グリオーマ細胞株を用い検証した。

(5) 5-ALA 併用放射線照射後に発生する活性酸素種局在

5-ALA 併用放射線照射後の悪性グリオーマ細胞株 (9L) における遅発性活性酸素種とミトコンドリアの局在について、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM5; Carl Zeiss 社) を使用し評価を行った。

(6) 5-ALA 併用放射線照射によるミトコンドリアの変化

がん細胞において放射線照射後に遅発性に活性酸素種が産生され、ミトコンドリアの変化 (量・機能) を来すことが報告されている (Kam WW, Free Radic Biol Med 65: 607-619, 2013)。悪性グリオーマ細胞株において 5-ALA 併用放射線照射によりミトコンドリアの変化を調べるため、フローサイトメーターを使用し、ミトコンドリア量を定量した。さらに、ウエスタンブロッティング法を用いて、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体を評価した。

4. 研究成果

(1) ラットグリオーマ皮下腫瘍モデルにおける 5-ALA の放射線増感作用

ラットグリオーマ皮下腫瘍モデルにおいて、5-ALA を尾静脈から投与後 3 時間の時点で、PpIX 由来の蛍光を認めており、また、高速クロマトグラフィー法では、コントロールと比較し 5-ALA 投与群にて PpIX が有意に蓄積されていた (<0.1 vs 3.66 ± 0.91 pmol/mg-protein, $p<0.01$)。5-ALA から誘導される PpIX は、皮下腫瘍に十分に蓄積されていることから、実験モデルとして問題がないと判断した。その後、5-ALA 併用放射線照射を行い、経時的に腫瘍サイズを評価したが、放射線照射単独群と比較し 5-ALA 併用放射線照射群においては、Day10 以降で有意に腫瘍増殖抑制が確認された ($p<0.01$) (図 1)。一方、5-ALA のみを投与した群においては、未治療群と比較し、Day16 にて腫瘍増殖抑制を認めた ($p=0.0448$)。このことから、5-ALA そのものに宿主免疫に作用し抗腫瘍効果を呈することが示唆される。そのため、治療後の皮下腫瘍に対する組織学的評価においては、HE 染色に加え、マクロファージ染色 (Iba-1) も行った。HE 染色ではどの群においても腫瘍内部に壊死巣を認めていたが、マクロファージ染色においてはその程度が異なっていた (図 2)。放射線治療単独群においては、Iba-1 陽性マクロファージが腫瘍表面に集簇しさらに、腫瘍内部に進展していることがわかった。さらに、5-ALA 併用放射線照射群においては、その集簇がさらに強く増強されていることがわかった。マイクロデンストメトリー法にて単位面積あたりに腫瘍に集簇する Iba-1 陽性マクロファージの状態を検討したが、5-ALA 併用放射線照射群においては、

他群と比較し有意にマクロファージが集簇していることがわかった。Iba-1 陽性マクロファージは、腫瘍内部においては、特に壊死と生細胞との境界に分布しており、一部に貪食増が確認された。コントロールでは、ほとんど Iba-1 陽性マクロファージの集簇は認めなかったが、5-ALA 投与群においては、腫瘍表面に集簇していることから、Iba-1 陽性マクロファージは、単に腫瘍内部の壊死巣の処理に誘導されているのではなく、5-ALA により宿主抗腫瘍免疫に作用し誘導されている可能性が示唆された。

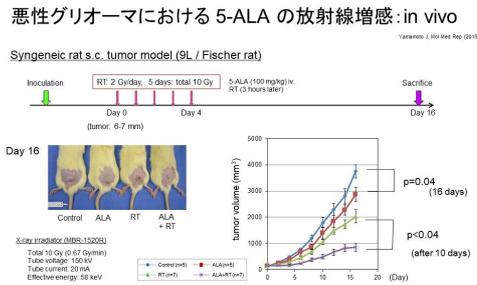


図 1

治療後の皮下腫瘍の病理学的所見

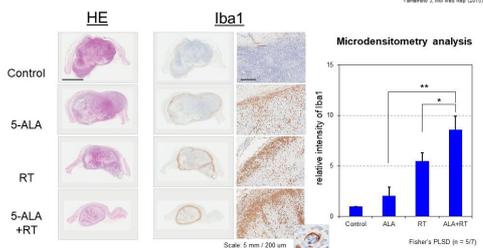


図 2

(2) 放射線照射後のラット glioma 細胞株における 5-ALA から誘導される PpIX 産生

放射線照射後の PpIX 産生量を照射 4, 12, 24 時間後の 3 点で評価を行った。9L では、PpIX 産生量はほとんど変化がなかったが、U251 では、経時的に増加傾向を示していた(図 3)。このことから、悪性 glioma 細胞株(生細胞)では、放射線照射は、5-ALA から PpIX への変換を阻害していないが、むしろ増強させていることが示唆された。

放射線照射後の細胞における PpIX の経時的変化

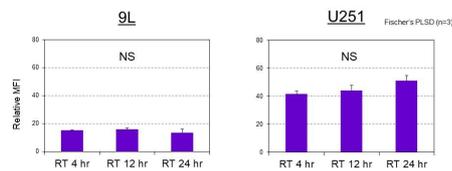


図 3

(3) 悪性 glioma 細胞株における 5-ALA 併用放射線照射後の活性酸素種産生

悪性 glioma 細胞株(9L, U251)を使用し、放射線照射直後および 12 時間後の細胞内活性酸素種定量を行った。活性酸素種産生は、照射直後に比べ 12 時間後では有意に増加し、従来の報告と同様に、経時的に活性酸素種産生が増加していることが分かった。さらに、5-ALA 併用放射線照射を行った群においては、12 時間後に発生する活性酸素種は、放射線単独群と比較し有意に増加していることが確認された(9L; $p=0.009$, U251; $p=0.031$) (図 4)

放射線照射と遅発性活性酸素

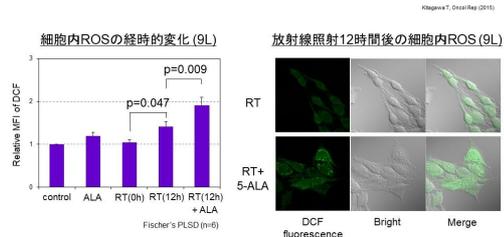


図 4

(4) 悪性 glioma 細胞株における 5-ALA から誘導される PpIX 蓄積量の変化と放射線増感作用

PpIX 蓄積量を増加させる薬剤 CPFIX の至適濃度を調べるため、MTT アッセイ法にて悪性 glioma 細胞株を使用し評価を行った。9L および U251 においては、 $5 \mu\text{M}$ であれば、CPFIX そのものの細胞毒性を示さないことが判明した。悪性 glioma 細胞株において、低用量 CPFIX ($5 \mu\text{M}$) で処理をすることで 5-ALA から誘導される PpIX が優位に増加していることが確認された。その後、5-ALA 併用放射線照射を悪性 glioma 細胞株に対して施行し、

殺細胞効果および遅発性に発生する活性酸素量を評価した。低用量 CPFX で処理を加えることにより、5-ALA 放射線照射においては、さらに殺細胞効果が増強され、遅発性活性酸素量も増加していることが判明した（図 5, 6）。これらの結果から、放射線増感効果は、5-ALA から誘導される PpIX の蓄積量と相関があることが示唆された。

低用量 CPFX と 5-ALA の効果 (放射線照射)

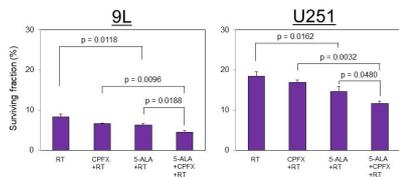


図 5

放射線照射後 (12 時間) の ROS 産生

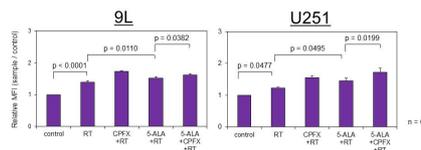


図 6

(5) 5-ALA 併用放射線照射後に発生する活性酸素種局在

悪性グリオーマ細胞株 (9L) を使用し、5-ALA 併用放射線照射を施行し遅発性に発生する活性酸素種とミトコンドリアとの局在を評価した。悪性グリオーマ細胞株においては、放射線照射後に活性酸素種産生が増加傾向にあるが、5-ALA で前処理を行うことでさらに増加し、この遅発性活性酸素種は、ミトコンドリアの局在に一致していた (図 7)。これらのことから、5-ALA 併用放射線照射により誘導される遅発性活性酸素種産生の大部分は、ミトコンドリアであることが判明した。

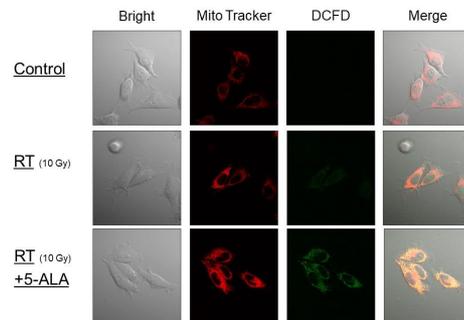


図 7

(6) 5-ALA 併用放射線照射によるミトコンドリアの変化

悪性グリオーマ細胞株 (9L, U251) を使用し、5-ALA 併用放射線照射を行い、照射直後および 12 時間後のミトコンドリア量の評価を行った。照射直後では、どの治療群において著変はなかったが、12 時間後にはいずれの群も増加していた。放射線照射単独群と比較し 5-ALA 併用放射線照射では有意に増加していた。さらに CPFX を併用した群においては、統計学的有意差は得られなかったものの増加傾向にあった。放射線直後および 12 時間後の悪性グリオーマ細胞株におけるミトコンドリア電子伝達系酵素複合体においては、Complex を除いて一定の傾向が得られなかった。Complex では、放射線直後と比較して 12 時間後では、コントロールと比較し 9L で有意に活性化していた ($p=0.0267$)、しかしながら、5-ALA 処理後の放射線照射群においては、放射線単独群と比較し、12 時間後では両細胞ともに有意に活性化を認めた (9L; $p=0.0365$, U251; $p=0.019$)。さらに、CPFX と 5-ALA を併用し放射線照射を行った群においては、5-ALA 併用放射線照射群と比較し 9L にて有意に活性化を認めた ($p=0.0415$)、U251 においても同様に増加傾向にあったが有意差は得られなかった。 ($p=0.5598$)。

本研究では、5-ALA の放射線増感作用に関するメカニズムについて、放射線照射後に発生する遅発性活性酸素種およびミトコンドリアに着目し研究を行った。5-ALA を併用した放射線照射を行った皮下腫瘍病理所見から、Iba-1 マクロファージの集簇が増強されていることから、宿主抗腫瘍免疫への関与が示唆される。一般的に、放射線照射による生物学的反応においては、照射中の電離放射線によりがん細胞の核 DNA が障害を受け、染色体異常をきたし、結果として細胞死 (増殖死 / 間期死) に至るといわれている。しかし、5-ALA を併用下放射線照射においては、本研究から、照射後に遅発性に発生する活性酸素種がミトコンドリアで有意に増加している

こと。その結果としてミトコンドリア量の増加や、ミトコンドリア電子伝達複合体 (Complex)の活性化を誘導していることが判明した。これらの現象は、PpIX 産生量の増加に伴い、増強されていることを考慮すれば、放射線照射中に PpIX がミトコンドリアに局所的に活性酸素産生を促進し、結果として損傷を受けたミトコンドリアが変化し、遅発性に持続的に活性酸素種を産生し細胞死や、宿主抗腫瘍免疫の増強を誘導している可能性が示唆される。現時点では、がん細胞において 5-ALA が放射線照射と併用した場合に、どのように核 DNA 損傷に影響するのか、また、核 DNA 損傷とミトコンドリアとの相互作用は不明であるが、5-ALA の放射線増感作用のメカニズムを解明していく上で、ミトコンドリアにおける環境変化に着目していくことが重要と考えられ、今後もさらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

- 1) Ueta K, Yamamoto J, Tanaka T, Nakano Y, Kitagawa T, Nishizawa S: 5-Aminolevulinic acid enhances mitochondrial stress upon ionizing irradiation exposure and increases delayed production of reactive oxygen species and cell death in glioma cells. *Int J Mol Med* Feb;39(2):387-398, 2017 (査読有)
- 2) Yamamoto J, Ogura S, Shimajiri S, Nakano Y, Akiba D, Kitagawa T, Ueta K, Tanaka T, Nishizawa S: 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX with multi-dose ionizing irradiation enhances host antitumor response and strongly inhibits tumor growth in experimental glioma in vivo. *Mol Med Rep* Mar;11(3):1813-9, 2015 (査読有)
- 3) Kitagawa T, Yamamoto J, Tanaka T, Nakano Y, Akiba D, Ueta K, Nishizawa S: 5-Aminolevulinic acid strongly enhances delayed intracellular production of reactive oxygen species (ROS) generated by ionizing irradiation: Quantitative analyses and visualization of intracellular ROS production in glioma cells in vitro. *Oncol Rep* Feb;33(2):583-590, 2015 (査読有)

[学会発表](計28件)

- 1) 山本淳考 「グリオーマと光感受性物質」～光治療・光診断を再考する～ 第18回日本分子脳神経外科学会

2017.8.25-26(甲府富士屋ホテル、山梨県甲府市) 教育講演1

- 2) 山本淳考 脳神経外科領域における 5-アミノレブリン酸の役割 ～現状と将来展望～ 第13回泌尿器科 Educational conference 2016.10.24(高知大学医学部、高知)(招待講演)
- 3) 山本淳考 脳神経外科領域における 5-ALAの役割(基礎) 第20回日本脳腫瘍の外科学会 2015.9.25-26(名古屋観光ホテル、名古屋)(ランチョンセミナー)
- 4) 山本淳考 悪性脳腫瘍に対する集学的治療における5-ALAの重要性と展望 第4回ポルフィリン-ALA学会年会(奨励賞受賞講演)2014.4.26(神戸)

[図書](計1件)

- 1) 山本淳考: “放射線治療の増感”. 現代化学増刊 45 5-アミノレブリン酸の科学と医学応用 -がんの診断・治療を中心に-, 大倉一郎編, 東京化学同人: 113-116 頁, 2015

[産業財産権]

出願状況(計6件)

名称: COMPOSITION FOR INDUCING TUMOR IMMUNITY

発明者: 山本淳考 他

権利者: 産業医科大学、SBI ファーマ(株)

番号: 15/120, 114

出願年月日: 平成28年8月18日

国内外の別: 国外(米国)

取得状況(計1件)

名称: 核磁気共鳴診断剤、及び、それを用いた、対象内の細胞、組織又は臓器の状態を検出又は診断する方法

発明者: 山本淳考 他

権利者: 産業医科大学 熊本大学 SBI ファーマ(株)

番号: 特許登録5980953

取得年月日: 平成28年8月5日

国内外の別: 日本

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 淳考(YAMAMOTO, Junkoh)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 80461565